

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-067218

(43)Date of publication of application : 07.03.1990

(51)Int.Cl.

A61K 31/35
A61K 31/045
A61K 31/56
A61K 31/70
// A61K 35/78
C07C 35/44
C07D311/36

(21)Application number : 63-217427

(71)Applicant : NAGAKURA SEIYAKU KK

(22)Date of filing : 31.08.1988

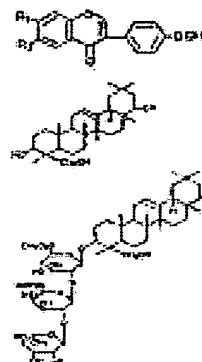
(72)Inventor : KIJIMA TAKAO
TOKUDA HARUKUNI
KOZUKA MUTSUO
TANABE MASAHIRO

(54) VIRUS GENOME INACTIVATOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a virus.genome inactivator containing a specific compound, such as afromosin or formononetin, as an active ingredient and effective in antiviral, carcinostatic use and preventing cancer.

CONSTITUTION: A virus.genome inactivator containing one or two or more of compounds, expressed by formula I, i.e., afromosin (R1 is OH; R2 is OCH3), formononetin (R1 is OH; R2 is H), ononin (R1 is O-glucose; R2 is H), wistin (R1 is O-glucose; R2 is OCH3), 7-O-acetyl-formononetin (R1 is O-acetyl; R2 is H) and 7-O-acetylafromosin (R1 is O-acetyl; R2 is OCH3), soyasapogenol B expressed by formula II and soyasapogenin I expressed by formula III and obtained from a plant belonging to the genus Wistaria as an active ingredient. The above-mentioned compounds are capable of remarkably inhibiting expressing of EB virus.genome by tetradecanoylphorbol acetate.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平2-67218

⑤Int.Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑬公開 平成2年(1990)3月7日
A 61 K 31/35 ADY 7475-4C
31/045 7330-4C
31/56 7375-4C
31/70 ADU 7431-4C※
審査請求 未請求 請求項の数 1 (全7頁)

⑭発明の名称 ウィルス・ゲノム不活化剤

⑯特 願 昭63-217427

⑰出 願 昭63(1988)8月31日

特許法第30条第1項適用 昭和63年3月10日、社団法人日本薬学会発行の「日本薬学会第108年会講演要旨集」に発表

⑱発明者 木 島 孝 夫 京都府京都市中京区三条通室町東入御倉町63番地
⑱発明者 徳 田 春 邦 京都府京都市左京区下鴨北園町3番地
⑱発明者 小 塚 睦 夫 京都府京都市上京区上御霊中町458番地
⑱発明者 田 部 昌 弘 大阪府大阪市西成区聖天下1丁目7-16 長倉製薬株式会社内
⑲出 願 人 長倉製薬株式会社 大阪府大阪市南区日本橋1丁目17番17号
⑳代理人 弁理士 青山 葆 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

ウィルス・ゲノム不活化剤

2. 特許請求の範囲

アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、
ウィスチン、ソヤサポゲノールB、ソヤサポニン
I、7-O-アセチル-フォルモノネチンおよび
7-O-アセチル-アフロモシンの一種または二
種以上を有効成分とする、ウィルス・ゲノム不
活化剤。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

この発明は、ウィルス・ゲノム不活化剤に関するものである。このような薬剤は、発癌プロモーター阻害剤として癌の治療に、およびウィルス病の治療に有用である。

[従来の技術および発明が解決しようとする課題]

発癌には刺激または炎症としての現象が必然的に伴うものであるという考え方に基づいて、発癌二段階実験が行われた。それ以来、発癌機構にお

いて、長期間の作用を要する二段階目のプロモーション(促進効果)が重要な過程として取上げられ、現在、その研究が巾広く進められている。ヒトの生活に関与する物質中には、さまざまな発癌プロモーター物質が存在するとともに、さまざまな抗発癌プロモーター物質も存在し、これらの物質はヒトの発癌に関連する重要な要因となっている。抗発癌プロモーターとしては、生薬中に活性成分の存在が認められることが次第に明らかになってきているが、まだその有効性を分析した例は少なく、その解析およびそれに基づく新たな薬剤の開発が望まれている。

[課題を解決するための手段]

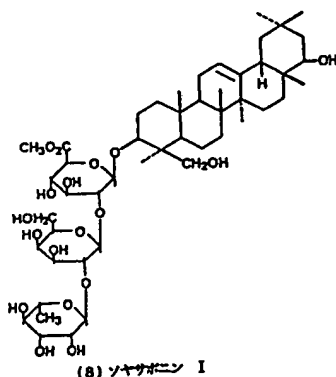
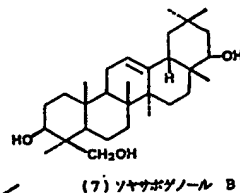
本発明者等は、発癌プロモーターがウィルス活性化剤と重なるところから、アフリカに多発するバーキット(Burkitt)・リンパ腫由来のエプスタイン・バー・ウィルス(Epstein Barr virus、以下EBウィルスと略称)を含むが、EBウィルス非産生のリンパ芽球様培養細胞であるラジ(Raji)細胞にプロモーターとしてテトラデカノイ

ルホルポールアセテート(以下、TPAと略称)を作用させることによりEBウィルスを活性化する系を用いて、薬用植物中に含まれるEBウィルス活性化抑制物質を検索したところ、フジ属に属する植物の抽出物から得られるアフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールBおよびソヤサポニンIがTPAによりEBウィルス活性化を顕著に抑制することを見出した。さらに、本発明者等は、これらに類縁する化合物について同様な検索を行ったところ、7-O-アセチル-フォルモノネチンおよび7-O-アセチル-アフロモシンが同様な抑制作用を有することを見出した。

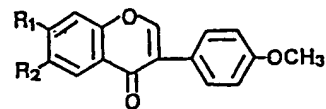
[発明の構成]

本発明は、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサポニンI、7-O-アセチル-フォルモノネチン、および7-O-アセチル-アフロモシンの一種または二種以上を有効成分として含有するウィルス・ゲノム不活化剤を提供するものである。

	R ₁	R ₂
(1)アフロモシン	-OH	-OCH ₃
(2)フォルモノネチン	-OH	-H
(3)オノニン	-O-β-D-グルコ-1	-H
(4)ウィスチン	-O-β-D-グルコ-1	-OCH ₃
(5)7-O-アセチル-フォルモノネチン	-O-7-β-D-グルコ-1	-H
(6)7-O-アセチル-アフロモシン	-O-7-β-D-グルコ-1	-OCH ₃



本発明の有効成分であるアフロモシン(1)、フォルモノネチン(2)、オノニン(3)、ウィスチン(4)、7-O-アセチル-フォルモノネチン(5)、7-O-アセチル-アフロモシン(6)、ソヤサボゲノールB(7)、ソヤサポニンI(8)は後記の式に示した構造を有する公知の化合物であり、文献ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・ブレットン(Chemical and Pharmaceutical Bulletin)11巻382頁(1963年)、薬学雑誌95巻1388頁(1975年)、ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・ブレットン(Chemical and Pharmaceutical Bulletin)24巻121頁(1976年)およびケミカル・アンド・ファーマシューティカル・ブレットン(Chemical and Pharmaceutical Bulletin)30巻2294頁(1982年)に記載されている。



これらの有効成分を含有する植物としては、フジ(*Wisteria floribunda*)、ヤマフジ(*Wisteria brachybotrys*)、シナフジ(*Wisteria sinensis*)等が知られている。これらの有効成分の上記植物からの抽出製造は公知の溶剤抽出法や転溶、濃縮、再結晶、再沈殿、各種クロマトグラフィー等の組み合わせによって達成することができる。その一例を示すと次の通りである。

例えば、ヤマフジ(*Wisteria brachybotrys*)の根および莖をメタノールで加温(60~70℃)抽出し、得られる抽出液をクロロホルムと水、n-BuOHと水で順次分配し、クロロホルム抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム/メタノールの混合溶媒で溶出してくるフラクションの濃縮物をメタノール/水から分別再結晶すると、アフロモシン、ソヤサボゲノールB、フォルモノネチン、ウィスチンが得られる。さらに、n-BuOH抽出物をカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーに付すと、オノニン、ソヤサポニンIが得られる。

このようにして得られる上記成分の物性値を下記に示す。

アフロモシンの物性値

分子式: $C_{17}H_{14}O_3$

EI-MS: 298 (M^+)

UV(EtOH): λ 319、259、206 nm

^{13}C -NMR(DMSO- d_6):

δ 173.9、158.5、152.6、
152.5、151.4、146.6、129.7、
124.2、122.3、116.0、113.3、
104.4、102.6、55.6、55.0 ppm。

フォルモノネチンの物性値

分子式: $C_{18}H_{14}O_3$

EI-MS: 268 (M^+)

UV(EtOH): λ 301、249、207 nm

^{13}C -NMR(DMSO- d_6):

δ 174.8、158.5、162.7、
159.1、157.6、153.1、130.2、
127.5、124.4、123.4、116.9、
115.3、113.7、102.2、55.3 ppm。

pm。

ソヤサボゲノールBの物性値

分子式: $C_{30}H_{30}O_3$

EI-MS: 458 (M^+)、440、238

^{13}C -NMR(Pyridine- D_5):

δ 144.6、122.2、80.0、75.4、
64.5、56.3、48.1、46.8、45.3、
43.1、42.3、40.0、38.9、38.0、
37.0、33.5、33.2、30.9、28.6、
28.4、26.4、25.7、24.1、23.6、
21.2、19.1、17.1、16.3 ppm。

ソヤサボニンIの物性値

分子式: $C_{28}H_{20}O_3$

比光密度: -8.8° ($C=1.0$, MeOH)

^{13}C -NMR(Pyridine- D_5):

δ 170.4、144.9、122.4、105.
5、102.5、101.8、91.3、78.2、
77.8、77.0、76.6、74.4、73.6、
72.8、72.7、72.4、71.2、69.4、
63.6、61.6、56.1、47.8、46.8、

ウィスチンの物性値

分子式: $C_{23}H_{22}O_{10}$

UV(EtOH): λ 320、260 nm

^{13}C -NMR(DMSO- d_6):

δ 173.9、158.6、153.0、
151.2、150.9、147.2、129.8、
124.0、122.5、117.5、113.4、
104.5、103.2、99.4、77.0、72.
8、69.4、76.5、60.5、55.7、55.
0 ppm。

オノニンの物性値

分子式: $C_{22}H_{22}O_3$

UV(EtOH): λ 301、259、233、2

11 nm

^{13}C -NMR(DMSO- d_6):

δ 174.3、161.1、158.7、
156.7、153.3、129.8、126.7、
123.7、123.1、118.2、115.3、
113.3、103.2、99.7、77.0、
72.9、69.4、76.3、60.5、55.0 p

45.3、43.9、42.4、42.3、39.9、
38.6、38.0、36.5、33.3、30.9、
28.7、26.7、26.5、25.7、24.1、
23.0、21.2、18.9、18.6、16.0
9、15.6 ppm。

また、7-O-アセチル-アフロモシンおよび
7-O-アセチル-フォルモノネチンは、各々ア
フロモシンならびにフォルモノネチンを慣用され
るアセチル化剤、例えば無水酢酸またはアセチル
クロリド、好ましくは無水酢酸/ピリジン混液で
処理することによって得られ、その物性値は下記
の通りである。

7-O-アセチル-アフロモシンの物性値

分子式: $C_{19}H_{16}O_3$

EI-MS: (M^+)、298

1H -NMR($CDCl_3$):

δ 2.37(3H,s)、3.85(3H,s)、3.9
4(3H,s)、6.99(2H,d)、7.24(1H,s)、
7.50(2H,d)、7.76(1H,s)、7.79(1
H,s)。

7-O-アセチル-フォルモノネチンの物性値

分子式: $C_{16}H_{14}O_5$ EI-MS: 316 (M^+), 268 1H -NMR($CDCl_3$):

δ 2.36 (3H, s), 3.86 (3H, s), 6.98 (2H, d), 7.16 (1H, dd), 7.29 (1H, d), 7.50 (2H, d), 7.98 (1H, s), 8.31 (1H, d).

この発明において、有効成分アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウイスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンI、7-O-アセチル-フォルモノネチンおよび7-O-アセチル-アフロモシンは、これを単独で使用することもでき、また二種以上を併用することもできる。併用する場合、相乗作用が見られることがある。併用に際しては、植物から抽出分離した個々の化合物または個々のアセチル化合物を混合してもよく、抽出精製過程で得られた二種以上の化合物の混合物、アフロモシンとフォルモノネチンの混合アセチル化合物、またはこれらの混合物を用いてもよい。

もしくは液体の医薬製剤用担体を用いて公知の方法で製造することができる。担体としては、例えばでんぷん、乳糖、ぶどう糖、ショ糖、デキストリン、セルロースおよびその誘導体、パラフィン、脂肪酸グリセリド、水、アルコール等が用いられる。また、製剤には他の有効成分、補佐剤、安定剤、乳化剤、けんだく化剤、結合剤、滑沢剤等の常用添加剤を含ませることができる。

上記のように、本発明で用いるアフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウイスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンI、7-O-アセチル-アフロモシンおよび7-O-アセチル-フォルモノネチンは、EBウイルス・ゲノムの発現を阻害することから、抗ウイルス剤および制がん剤としての利用が考えられる。

さらに、TPAのような発癌プロモーターの作用を阻害する働きは癌の予防にも効果が期待できることを示しており、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウイスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンI、7-O-アセチル-アフロ

モシン・ゲノム不活化およびそれに基づく抗癌、抗ウイルス作用を目的とする上記化合物の投与量は、勿論投与の目的、患者の年齢、状態、症状の重さ等によって異なるが、一般に目的とする作用を発揮するに十分な有効成分の濃度をもたらす量であり、これは通常10~10000 $\mu g/m^2$ である。哺乳動物に投与する場合、通常20~5000 mgを1日2~4回の分割投与または持続性製剤として投与する。なお、上記化合物をマウスに投与した場合顕著な毒性が見られなかった。

投与に際しては、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウイスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサボニンI、7-O-アセチル-アフロモシン、7-O-アセチル-フォルモノネチンの有効量かつ非毒性量を含有する組成物(製剤)の形で医薬として用いることができる。このような製剤には、例えば経口剤として、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、顆粒剤、散剤等の固体製剤または水剤、シロップ等の液剤製剤が含まれる。これら各種の製剤は慣用の無機もしくは有機のまたは固体

ロモシンおよび7-O-アセチル-フォルモノネチンを有効成分とする癌予防薬や健康食品としての応用も可能である。

上記EBウイルス・ゲノムの発現阻害作用は、例えば、前述のラジ(Raji)細胞培養系に発癌プロモーターであるTPAと活性発現のために相乗作用として働くn-酪酸、それに被験物質を加え培養し、TPAにより活性化されて細胞表面上に発現にされるEBV-EA(EBウイルス-早期抗原)を上咽頭癌患者由来の抗体を用いる間接蛍光抗体法で検出することからなる方法により、観察することができる。また、この発明で用いる化合物はパピロウイルスに対しても効果を示す。

次に、この発明で用いる化合物のEBウイルス・ゲノム発現阻害活性について実施例により説明する。

[実施例1]

細胞を継代、維持するための培養液として、RPMI 1640の溶液に仔牛血清とペニシリン、ストレプトマイシンの抗生物質を加えたものを使

用し、その培養液にてラジ(Raji)細胞を37℃の条件で培養した細胞を検索用の指示細胞とした。この細胞を基礎培地中で 1×10^5 細胞/mlの濃度にした後、4 mMのn-酪酸、20 ng/mlのTPAを加え、それに試験物質を反応させて、37℃で48時間、炭酸ガス下で培養を行った。反応後、鼻咽頭癌患者血清を使用した抗原抗体反応によりEBV-EAを間接蛍光抗体法により検出し、その陽性細胞の発現をTPAのみを加えた対照と比較し、その割合について検討したところ、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサポニンIはそれぞれ抑制率が、66.7%、39.7%、29.8%、21.5%、75.2%、62.5%であった。また同時に行った細胞生存率は70%以上で、細胞毒性は認められない。この結果を第1図に示す。

さらに、7-O-アセチル-アフロモシンおよび7-O-アセチル-フォルモノネチンについても同様に試験したところ、その抑制率が、73.0%、66.6%また細胞生存率については、7

0%以上であった。この結果を第2図に示す。

さらに、これら化合物を、任意の割合で混ぜ合わせることによる、相乗効果の有意性についての評価を行ったところ、その一例として、フォルモノネチンのみでは抑制率が39.7%であったが、フォルモノネチンにアフロモシンを混合した場合、それに、オノニン、ウィスチンを等モルで混合した試料での抑制率はそれぞれ39.7%、69.4%、74.0%、95.1%の値を示し、各試料を同時に使用することの有用性が認められた。この結果を第3図に示す。

[発明の効果]

以上のように本発明で用いるアフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールB、ソヤサポニンIならびに7-O-アセチル-フォルモノネチン、7-O-アセチル-アフロモシンの一種または二種以上の混合物は、TPAによるEBV-EAの発現を顕著に阻害することから、ウィルス・ゲノムの不活化剤として使用することができ、抗ウィルス、制がん、がん

予防の目的で医薬製剤としてまたは食品に混合して使用することが可能である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1において、アフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールBおよびソヤサポニンIの濃度に対するEBウィルス・ゲノムの発現阻害活性を示すグラフであり、横軸はTPAに対するアフロモシン、フォルモノネチン、オノニン、ウィスチン、ソヤサボゲノールBまたはソヤサポニンIのモル比を、縦軸は発現阻害率と細胞生存率を示す。

第2図は、実施例1において、7-O-アセチル-アフロモシンおよび7-O-アセチル-フォルモノネチンの濃度に対するEBウィルス・ゲノムの発現活性を示すグラフであり、横軸はTPAに対する7-O-アセチル-アフロモシンまたは7-O-アセチル-フォルモノネチンのモル比を、縦軸は発現阻害率と細胞生存率を示す。

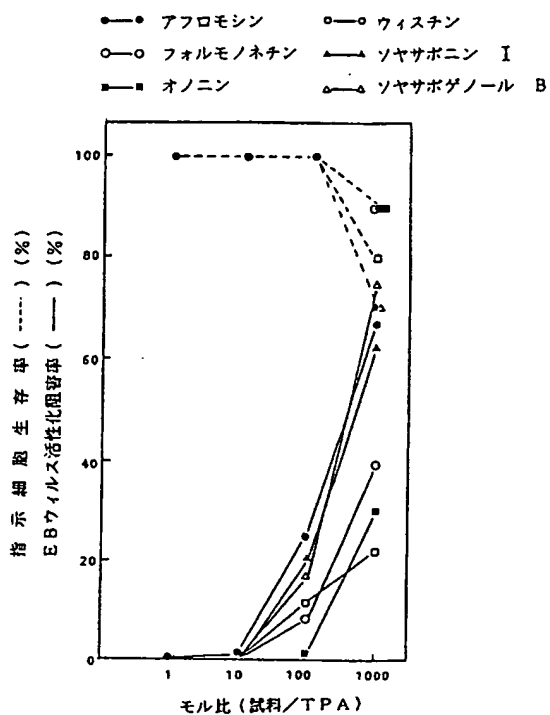
第3図は、実施例1において、二種以上の化合物を併用した場合の結果を示すグラフであり、横

軸はTPAに対する化合物のモル比、縦軸は発現阻害率と細胞生存率を示す。

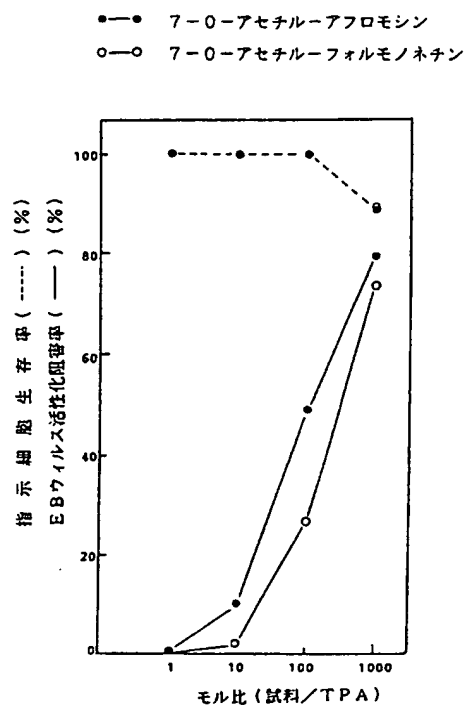
特許出願人 長倉製薬株式会社

代理人 弁理士 青山 傑 ほか1名

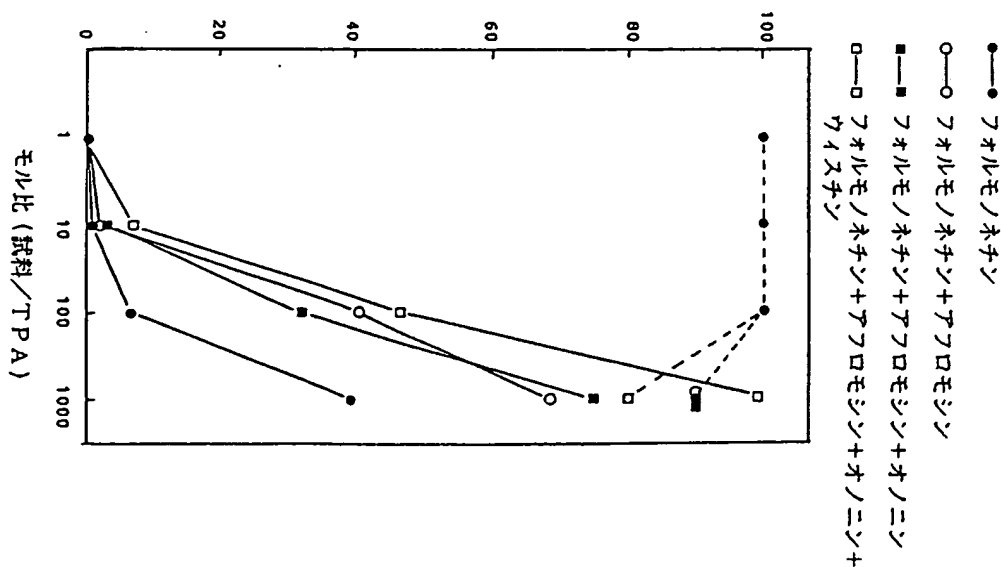
第1図



第2図



指示細胞生存率 (----) (%)
EBウィルス活性化阻害率 (——) (%)



第3図

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

// A 61 K 35/78
C 07 C 35/44
C 07 D 311/36

識別記号

J

庁内整理番号

8413-4C